

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
7. Juni 2001 (07.06.2001)

PCT

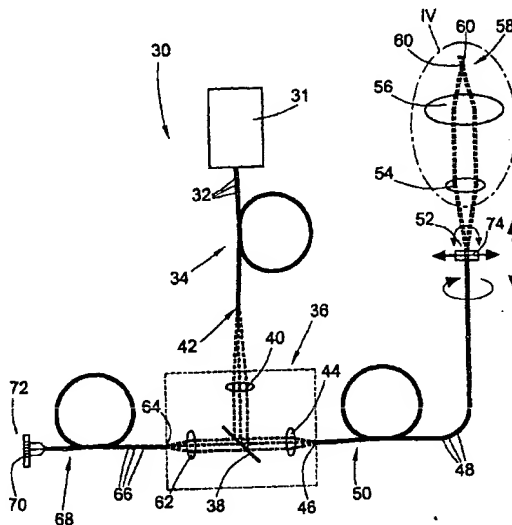
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/40769 A2**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **G01N 21/00** (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **EVOTEC BIOSYSTEMS AG** [DE/DE]; Schnackenburgallee 114, 22525 Hamburg (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP00/12126** (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **GARBOW, Norbert** [DE/DE]; Kamerstuecken 28, 22589 Hamburg (DE).
- (22) Internationales Anmeldedatum: 2. Dezember 2000 (02.12.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (74) Anwälte: **HILLERINGMANN, Jochen** usw.; Postfach 10 22 41, 50462 Köln (DE).
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (81) Bestimmungsstaaten (national): AU, JP, US.
- (30) Angaben zur Priorität: 199 57 974.1 2. Dezember 1999 (02.12.1999) DE (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: HIGH RATE SCREENING METHOD AND DEVICE FOR OPTICALLY DETECTING SAMPLES

(54) Bezeichnung: HOCHDURCHSATZSCREENING-VERFAHREN UND -VORRICHTUNG ZUR OPTISCHEN ERFASSUNG VON PROBEN



(57) Abstract: The invention relates to a high rate screening method according to which a first electromagnetic radiation is generated by at least one radiation generating device (31) and this radiation is simultaneously guided in a multitude of first optical fibers (34) to at least one beam splitting device (36) from which the first electromagnetic radiation is simultaneously guided in a multitude of second optical fibers (48) to focussing optics (56). Said focussing optics (56) are used to simultaneously focus the first electromagnetic radiation into a multitude of foci (60), which are located inside the measurement volumes of the sample that are to be detected. The second electromagnetic radiation emitted by the measurement volumes of the sample is guided by means of the multitude of second optical fibers (48) from the focussing optics (56) to the at least one beam splitting device (36) from which the second electromagnetic radiation is routed to separate detector regions (70) of at least one detector device (72). Said detector regions are arranged outside of the beam path, which extends from the at least one radiation generating device (31) via the at least one beam splitting device (36) and up to the focussing optics (56), and they detect the second electromagnetic radiation. The measured data which is generated on the basis of the detected second electromagnetic radiation is processed.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

BEST AVAILABLE COPY

**Veröffentlicht:**

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

**(57) Zusammenfassung:** Für das Hochdurchsatzscreening wird eine erste elektromagnetische Strahlung mit mindestens einer Strahlungserzeugungsvorrichtung (31) erzeugt und diese simultan in einer Vielzahl von ersten optischen Fasern (34) zu mindestens einer Strahlteilverrichtung (36) geleitet, von der ausgehend die erste elektromagnetische Strahlung simultan in einer Vielzahl von zweiten optischen Fasern (48) zu einer Fokussieroptik (56) geleitet wird. Die erste elektromagnetische Strahlung wird mittels der Fokussieroptik (56) simultan in eine Vielzahl von Foki (60) fokussiert, die innerhalb zu erfassender Probenmessvolumina liegen. Von den Probenmessvolumina emittierte zweite elektromagnetische Strahlung wird mittels der Vielzahl von zweiten optischen Fasern (48) von der Fokussieroptik (56) zu der mindestens einen Strahlteilverrichtung (36) geleitet, von der ausgehend die zweite elektromagnetische Strahlung zu getrennten Detektorbereichen (70) mindestens einer Detektorvorrichtung (72) weitergeleitet wird, die außerhalb des sich von der mindestens einen Strahlungserzeugungsvorrichtung (31) über die mindestens eine Strahlteilverrichtung (36) bis zur Fokussieroptik (56) erstreckenden Strahlenganges angeordnet sind und die die zweite elektromagnetische Strahlung erfassen. Die Messdaten, die auf der Grundlage der erfassten zweiten elektromagnetischen Strahlung generiert werden, werden verarbeitet.

### **Hochdurchsatzscreening-Verfahren und -Vorrichtung zur optischen Erfassung von Proben**

Die Erfindung betrifft ein Hochdurchsatzscreening-Verfahren und eine Hochdurchsatzscreening-Vorrichtung zur optischen Erfassung von Proben.

Bei einer Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie-(FCS-)Messung wird die  
5 Änderung der Anzahl von Molekülen in einem Messvolumen untersucht. Diese sogenannten Anzahlvariationen sind besonders gut detektierbar, wenn die mittlere Zahl der Moleküle im Messvolumen klein ist (etwa 1). Daher ist es erforderlich, ein möglichst kleines Messvolumen (Durchmesser kleiner als 1  $\mu\text{m}$ ) in der Probe, etwa einer Lösung von Reagenzien, zu betrachten.

10

Diese Aufgabe kann ohne Störung der Probe ("berührungslos") durchgeführt werden, indem ein Laserstrahl von einer geeigneten Optik in die Probe hinein fokussiert wird. Mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte ("gelabelte") Moleküle werden angeregt und leuchten auf, wenn sie sich durch den Fokus bewe-  
15 gen. Aus der gemessenen Helligkeit bzw. aus den Helligkeitsvariationen können die Diffusionseigenschaften und Konzentration der gelabelten Moleküle bestimmt werden.

Das Messvolumen wird aus dem Produkt von Intensitätsverteilung des Anregungslichtes und dem Gesichtsfeld des Detektors bestimmt. Das Mess-  
20 volumen wird minimal, wenn die Maxima beider Verteilungen zur Deckung kommen. Sind die Werte der Verteilungen außerhalb des Fokusbereiches sehr klein, wird gleichzeitig sichergestellt, dass kein Fluoreszenzlicht detektiert wird, das nicht aus dem Fokus stammt. Um kleinstmögliche Messvolumina zu erhalten und um einen möglichst großen Anteil des von dort emittierten Fluoreszenzlichtes detektieren zu können, sollte die numerische Apertur der Fokus-  
25

sieroptik möglichst groß sein. Ferner sollten der anregenden Laser in der TEM<sub>00</sub>-Grundmode strahlen und der Detektor quasi punktförmig sein. Dazu wird sein Gesichtsfeld gegebenenfalls durch eine kleine Blende ("Pinhole") beschränkt.

5

Ein relativ einfaches Schema, um dieses zu ermöglichen, wird mit einer konfokalen Optik realisiert: Ein Objektiv fokussiert das anregende Laserlicht und sammelt ebenfalls das Fluoreszenzlicht, um es auf den Detektor abzubilden. Zwischen Objektiv und Detektor trennt ein dichroitischer Strahlteiler das Anregungs- und Fluoreszenzlicht.

10

Auf Grund der breiten Verteilung der Wellenlänge in einer Fluoreszenzanwendung hat die fokussierende Optik im allgemeinen unterschiedliche Brennweiten für Anregungs- und Fluoreszenzlicht. Die daraus resultierende chromatische Fokusverschiebung kann durch eine Justage von Pinhole oder eventuell davor liegender Zusatzoptik kompensiert werden. Ein entsprechendes Aufbauschema wird in Fig. 1 dargestellt.

15

Gemäß Fig. 1 wird von einer Strahlungserzeugungsvorrichtung in Form eines Lasers 10 eine erste magnetische Anregungsstrahlung erzeugt, die über eine Strahlteiltervorrichtung 12 in Form eines dichroitischen Spiegels zu einer Fokussieroptik 14 weitergeleitet wird. Durch die Fokussieroptik 14 wird die Anregungsstrahlung auf einen Fokus 16 fokussiert. Dieser Fokus 16 definiert das Messvolumen der Probe, die zu untersuchen ist. Die in dieser Probe auf Grund der Anregungsstrahlung erzeugte zweite magnetische Emissionsstrahlung, die von der Anregungsstrahlung verschieden ist, wird über die Fokussieroptik 14 zu der Strahlteiltervorrichtung 12 geleitet. Die Emissionsstrahlung passiert die Strahlteiltervorrichtung 12 und wird über eine Linse 18 und eine Blende 20 auf einen Detektor 22 gerichtet.

20

25

30

Ein gewisser Nachteil des angegebenen Aufbauschemas ist darin zu sehen, die Gesichtsfeldblende des Detektors korrekt justieren zu müssen. Vermeidbar ist dies, wenn die fokussierende Optik keine chromatischen Fokusverschiebungen

aufweist, bzw. diese deutlich kleiner als die Länge des Fokus (Rayleighlänge) sind. Wie in dem Beispiel nach Fig. 2 gezeigt ist, können dann Anregungs- und Fluoreszenzlicht durch genau eine Gesichtsfeldblende begrenzt werden. Diese braucht in Bezug auf die Fokussieroptik nicht mehr nachjustiert werden.

5

Aus US-A-5 120 953 ist ein konfokales Scanning-Mikroskop bekannt, bei dem die Strahlung zwischen der Strahlungserzeugungsvorrichtung und der Fokussieroptik sowie zwischen der Fokussieroptik und der Detektorvorrichtung über einzelne oder mehrere Fasern übertragen wird. Die Strahlteilervorrichtung ist als Faserkoppler ausgebildet. Ein gewisser Nachteil von Faserkopplern ist, dass sie keine besonders gute Separation zwischen dem Sende- und dem Empfangslicht erlauben. Insbesondere für hochempfindliche Fluoreszenzanwendungen sind sie denkbar ungünstig. Für Streulichthintergrund bei Faserkopplern zumeist störend auswirken. Darüber hinaus lässt sich das bekannte konfokale Scanning-Mikroskop nicht zur parallelen Untersuchung mehrerer Probenmessvolumina anhand von Einzelphotonendetektionen einsetzen.

20

Des Weiteren ist aus EP-A-0 523 159 ein konfokales Mikroskop bekannt, bei dem konfokale Faserbündel für fotografische Zwecke eingesetzt werden. Die Art der Einkopplung des Sendelichts ist jedoch für den Betrieb mit Single-Mode-Wellenleitern, wie sie für Korrelationsspektrographische Messungen im allgemeinen benutzt werden, denkbar ungünstig, da nahezu kein Anregungslicht in die Probe eingekoppelt werden könnte.

25

Der Erfindung liegt die Aufgabe zu Grunde, eine Vorrichtung und ein Verfahren zur optischen Erfassung einer Vielzahl von Probenmessvolumina für Hochdurchsatzscreening-Anwendungen zu schaffen.

30

Zur Lösung dieser Aufgabe wird mit der Erfindung ein Verfahren mit den folgenden Schritten vorgeschlagen:

- Erzeugen einer ersten elektromagnetischen Strahlung mit mindestens einer Strahlungserzeugungsvorrichtung,

- Leiten der ersten elektromagnetischen Strahlung simultan in einer Vielzahl von ersten optischen Fasern zu mindestens einer Strahlteilverrichtung, von der ausgehend die erste elektromagnetische Strahlung simultan in einer Vielzahl von zweiten optischen Fasern zu einer Fokussieroptik geleitet wird,
- Fokussieren der ersten elektromagnetischen Strahlung mittels der Fokussieroptik simultan in eine Vielzahl von Foki, die innerhalb zu erfassender Probenmessvolumina liegen,
- Leiten einer von den Probenmessvolumina emittierten zweiten elektromagnetischen Strahlung mittels der Vielzahl von zweiten optischen Fasern von der Fokussieroptik zu der mindestens einen Strahlteilverrichtung, von der ausgehend die zweite elektromagnetische Strahlung zu getrennten Detektorbereichen mindestens einer Detektorvorrichtung weitergeleitet wird, die außerhalb des sich von der mindestens einen Strahlungserzeugungsvorrichtung über die mindestens eine Strahlteilverrichtung bis zur Fokussieroptik erstreckenden Strahlenganges angeordnet sind und die die zweite elektromagnetische Strahlung erfassen, und
- Verarbeiten von Messdaten, die auf der Grundlage der erfassten zweiten elektromagnetischen Strahlung generierten werden.

20

Die erfindungsgemäße Vorrichtung, mit der sich beispielsweise das vorstehend angegebene Verfahren durchführen lässt, ist versehen mit

- mindestens einer Strahlungserzeugungsvorrichtung für eine erste elektromagnetische Strahlung,
- einer Fokussieroptik mit einem Fokussierobjektiv zur Fokussierung der ersten elektromagnetischen Strahlung innerhalb eines Fokussierbereichs,
- mindestens einer Strahlteilverrichtung, die zwischen der mindestens einen Strahlungserzeugungsvorrichtung und der Fokussieroptik angeordnet ist und die die erste elektromagnetische Strahlung zur Fokussieroptik weiterleitet,
- mindestens einer Einzelphotonen-Detektorvorrichtung, die außerhalb des sich von der mindestens einen Strahlungserzeugungsvorrichtung über die mindestens eine Strahlteilverrichtung bis zur Fokussieroptik er-

streckenden Strahlenganges angeordnet ist und vom Fokussierbereich des Fokussierobjektivs ausgehende sowie von der mindestens einen Strahlteilervorrichtung separierte zweite elektromagnetische Strahlung empfängt, wobei

- 5 - zwischen der mindestens einen Strahlungserzeugungsvorrichtung und der mindestens einen Strahlteilervorrichtung eine Vielzahl von ersten optischen Fasern angeordnet ist, aus deren der mindestens einen Strahlteilervorrichtung zugewandten Enden von der mindestens einen Strahlungserzeugungsvorrichtung in die dieser zugewandte Enden der ersten optischen Fasern eingespeiste erste elektromagnetische Strahlung austritt,
- 10 - zwischen der mindestens einen Strahlteilervorrichtung und der Fokussieroptik eine Vielzahl von zweiten optischen Fasern angeordnet ist,
- die der mindestens einen Strahlteilervorrichtung zugewandten Enden der ersten optischen Fasern auf die der mindestens einen Strahlteilervorrichtung zugewandten Enden der zweiten optischen Fasern optisch abgebildet sind,
- 15 - aus den der Fokussieroptik zugewandten Enden der zweiten optischen Fasern austretende erste elektromagnetische Strahlung durch das Fokussierobjektiv in eine Vielzahl von Foki innerhalb des Fokussierbereichs fokussiert ist und
- 20 - die der mindestens einen Strahlteilervorrichtung zugewandten Enden der zweiten optischen Fasern zur Detektion von Einzelphotonen in der aus diesen Enden der zweiten optischen Fasern austretenden zweiten elektromagnetischen Strahlung auf getrennte Detektorbereiche der mindestens einen Detektorvorrichtung optisch abgebildet sind.
- 25

In den Unteransprüchen sind die Merkmale einzelner Ausführungsbeispiele der Erfindung angegeben.

- 30 Bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung werden zur Übertragung der Anregungsstrahlung (erste elektromagnetische Strahlung) und zur Übertragung der Detektionsstrahlung (zweite elektromagnetische Strahlung) jeweils mehrere optische Fasern verwendet. Dabei ist eine erste Vielzahl von optischen Fasern

- zwischen der Fokussieroptik und der Strahlteilervorrichtung und eine zweite Vielzahl von optischen Fasern zwischen der Strahlteilervorrichtung und der Detektorvorrichtung angeordnet. Statt einer Strahlteilervorrichtung und einer Detektorvorrichtung können erfindungsgemäß auch mehrere Strahlteiler- und mehrere Detektorvorrichtung eingesetzt werden. Die Einspeisung der ersten elektromagnetischen Strahlung (Anregungsstrahlung) in die Strahlteilervorrichtung erfolgt zweckmäßigerweise wiederum durch eine Vielzahl von dritten optischen Fasern. Dies ist allerdings nicht zwingend erforderlich. Als Detektorvorrichtungen sind mehrere Varianten möglich. So ist es beispielsweise denkbar, eine Detektorvorrichtung mit unterschiedlichen empfindlichen Bereichen oder eine mehrere Einzeldetektoren umfassende Detektorvorrichtung vorzusehen. Schließlich kann auch eine Detektorvorrichtung Verwendung finden, die sämtlichen Foki zwecks Messung der Gesamtintensität zugeordnet ist.
- 15 Nach der Erfindung wird also die Anregungsstrahlung über ein erstes Faserbündel zur Strahlteilervorrichtung geleitet. Dort trifft sie beispielsweise über eine Linse auf den eigentlichen Strahlteiler, bei dem es sich vorzugsweise um einen dichroitischen Spiegel handelt, auf. Die der Strahlteilervorrichtung zugewandten Enden dieses ersten Faserbündels sind wie einzelne Punktlichtquellen zu betrachten. Die aus diesen Punktlichtquellen austretende Strahlung wird sozusagen parallel und gleichzeitig von der Strahlteilervorrichtung zu den dieser zugewandten Enden eines zweiten Faserbündels weitergeleitet, indem diese Strahlung in einer der Anzahl der Fasern des zweiten Faserbündels gleichen Anzahl von Foki fokussiert wird. Mit anderen Worten werden also die der Strahlteilervorrichtung zugewandten Enden der Fasern des ersten Faserbündels auf die der Strahlteilervorrichtung zugewandten Enden der Fasern des zweiten Faserbündels abgebildet.

- Anschließend wird die so in das zweite Faserbündel eingekoppelte Anregungsstrahlung bis zur Fokussieroptik geleitet, um dort in eine Vielzahl von Foki fokussiert zu werden. Auch hier gilt wiederum, dass die der Fokussieroptik zugewandten Enden der Fasern des zweiten Faserbündels wie einzelne Punktlichtquellen zu betrachten sind. Die Fokussieroptik fokussiert das Licht jeder



dieser punktförmigen Lichtquellen in einzelne Foki. Diese Foki definieren die Probenmessvolumina.

Durch das Anregungslicht werden in den Messvolumina Emissionsstrahlungen erzeugt, sofern sich in diesen Messvolumina entsprechend präparierte bzw. entsprechend beschaffene Substanzen (beispielsweise Moleküle, Analyten, Zellen, Zellbruchstücke o.dgl.) befinden. Das Emissionslicht, bei dem es sich um einzelne wenige Photonen handeln kann, wird über die Fokussieroptik in die den einzelnen Probenmessvolumina zugeordneten Fasern des zweiten Faserbündels eingespeist. Durch die Strahlteilervorrichtung kommt es zu einer Separation der optischen Pfade von Anregungs- und Emissionsstrahlung. Die die Strahlteilervorrichtung passierende Anregungsstrahlung trifft auf die lichtempfindlichen Detektionsbereiche einer Detektorvorrichtung auf, bei der es sich beispielsweise um einen Photomultiplier handelt, der hochzeitaufgelöste Messsignale erzeugt. Auf Grund dieser hohen Zeitauflösung im Submilli- oder Submikro- bzw. Nanosekundenbereich ist es möglich, in den Messvolumina einzelne Photonen zu detektieren. Durch entsprechende Korrelation der Messsignale können dann fluoreszenzspektographische Untersuchungen der Probenmessvolumina durchgeführt werden.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung und das erfindungsgemäße Verfahren haben den Vorteil, dass Hochdurchsatzscreening-Anwendungen durchgeführt werden können. Diese Hochdurchsatzscreening-Anwendungen sind auf Grund der Parallelisierung möglich, indem nämlich eine Vielzahl von Foki und damit Probenmessvolumina gleichzeitig untersucht werden können. Der Aufbau der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist denkbar einfach, was durch die Verwendung von optisch aufeinander abgebildete Faserbündel ermöglicht wird. Diese Faserbündel sorgen ferner dafür, dass die optischen Verluste gering sind, so dass mittels Anregungsstrahlung hoher Intensität in den Probenmessvolumina Emissionsstrahlung erzeugt werden kann, die auf die Erzeugung von wenigen einzelnen Photonen zurückzuführen ist. Diese äußerst schwache Emissionsstrahlung kann dennoch durch die Detektorvorrichtung detektiert werden, da

nämlich auch diesbezüglich gilt, dass die optischen Verluste durch die Verwendung von Faserbündeln gering ist.

Die Erfindung und insbesondere die Anordnung der Fasern zeichnet sich  
5 gegenüber dem Stand der Technik durch folgende vorteilhafte Merkmale aus:

1. Von der Strahlungserzeugungsvorrichtung - wie z.B. einem oder mehreren Lasern - ausgehend ist es durch eine Vielzahl von ersten optischen Fasern möglich, die erste elektromagnetische Strahlung effektiv in die  
10 zweiten optischen Fasern überzukoppeln.
2. Durch Wahl der Abstände zwischen den der Fokussieroptik zugewandten Enden der zweiten Fasern kann die relative Lage der Foki innerhalb der Proben optimal auf den jeweiligen Anwendungszweck abgestimmt werden. So kann es insbesondere wünschenswert sein, viele Foki innerhalb  
15 einer in einer Aufnahmevertiefung einer handelsüblichen Mikro-/Nanotiterplatte befindlichen Probe anzuordnen. Hierdurch wird simultan mit nur einem geringen Zeitaufwand ein statistisch relevantes Messergebnis für diese Probe erhältlich. Dies ist insbesondere für Hochdurchsatzscreening-Anwendungen vorteilhaft. Ein Übersprechen der zweiten elektromagnetischen Strahlung aus einzelnen Foki in diesen nicht zugeordneten Faserkanälen kann somit verhindert oder zumindest minimiert werden.
- 20 3. Es ist oftmals wünschenswert, als zweite elektromagnetische Strahlung eine gegenüber der ersten Strahlung wellenlängenverschobene Strahlung
- 25

wie Fluoreszenz zu detektieren. Die erfindungsgemäße Anordnung bietet auch in diesem Fall Vorteile dahingehend, daß an die jeweilige Anwendung angepasste wellenlängen-selektive Strahlteiler Elemente, insbesondere dichroitische Spiegel, eingesetzt werden können. Diese erlauben ein effektives Überkoppeln sowohl der ersten als auch der zweiten elektromagnetischen Strahlung. Die üblicherweise im Stand der Technik beschriebenen faseroptischen Aufbauten verwenden nur schwach wellenlängenselektive Faserkoppler, die jedoch den Nachteil haben, daß sie entweder hohe Verluste in der Anregungs- oder Detektionsstrahlung oder dem Produkt aus beidem aufweisen. In einem einkanaligen Faseraufbau ist dies noch tolerierbar, da die Verluste so gewählt werden können, daß sie laserseitig entstehen (z.B. durch 90/10-Koppler) und durch eine hohe Laserleistung kompensiert werden können. Bei einem Mehrkanalaufbau wird jedoch die Laserleistung auf viele Kanäle verteilt und ein derartiges Vorgehen ist nicht mehr praktikabel.

4. Der Einsatz von getrennten ersten und zweiten Fasern erlaubt die Möglichkeit, polarisationserhaltende Fasern einzusetzen. Polarisationserhaltende X-förmige Faserkoppler, die direkt mit den Fasern verbunden sind, sind, falls überhaupt, nur schwer herstellbar. Im Hochdurchsatzscreening ist es jedoch oftmals wünschenswert, kostengünstig und effizient Polarisationsmessungen wegen ihres hohen Informationsgehaltes durchzuführen, welches durch den erfindungsgemäßen Aufbau unter Verwendung eines detektionsseitigen polarisationsselektiven Strahlteiler Elementes ermöglicht wird.

5. Insbesondere ist die Verwendung von bündelförmig angeordneten ersten und zweiten Fasern vorteilhaft. Hierdurch reduziert sich im Vergleich zur Verwendung jeweils einer Vielzahl einzelner Fasern der Justageaufwand erheblich, welches für die Herstellung und die spätere Verwendung im Hochdurchsatzscreening (HTS) vorteilhaft ist.

Insbesondere beim Einsatz von Fokussierobjektiven hoher numerischer Apertur ist die Forderung, dass chromatische Fehler deutlich kleiner als die Fokusgröße sind bzw. bleiben, nur schwer realisierbar. Das gemäß einer vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung zur Verwendung kommende Fokussierobjektiv weist zweckmäßigerweise eine numerische Apertur von größer oder gleich 0,6, vorzugsweise 0,9, insbesondere 1,2, auf. Insbesondere die Kombination eines solchen Objektivs mit einer achromatischen Linse als Kolimator erfüllt die oben angegebenen Bedingungen betreffend den chromatischen Fehler.

In vorteilhafter Weiterbildung der Erfindung ist vorgesehen, dass die Fokussieroptik optische Elemente aufweist, die im wesentlichen refraktiv arbeiten.

- Alternativen zu refraktiv arbeitenden optischen Elementen sind z.B. ein reflektives Spiegelobjektiv oder ein diffraktives Wölbungsobjektiv.

Wie bereits oben kurz erwähnt, ist es zweckmäßig, wenn zwischen der mindestens einen Strahlteilervorrichtung und der mindestens einen Detektorvorrichtung eine Vielzahl von dritten Fasern angeordnet ist, wobei die der mindestens einen Strahlteilervorrichtung zugewandten Enden der zweiten Fasern auf die der mindestens einen Strahlteilervorrichtung zugewandten Enden der dritten Fasern optisch abgebildet sind und die der mindestens einen Strahlteilervorrichtung abgewandten Enden der dritten Fasern auf die mindestens eine Detektorvorrichtung abgebildet sind.

Bei einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung ist vorgesehen, dass die Enden der Fasern zur Erzeugung eines hohen Grades an optischer Aus- und Einkopplung der ersten und zweiten elektromagnetischen Strahlung entspiegelte Stirnflächen aufweisen.

5

Mögliche Ausgestaltungen der Fasern sind, dass die Stirnflächen der Fasern im wesentlichen rechtwinklig zur Längsachse verlaufen, oder dass standardmäßig angeschliffene Fasern verwendet werden.

10   Zweckmäßigerweise separiert die mindestens eine Strahlteilervorrichtung die erste und zweite elektromagnetische Strahlung in Abhängigkeit von ihrer Polarisation, ihrer Ausbreitungsrichtung, ihrer Wellenlänge und/oder ihrer Intensität.

15   Die Aufteilung der Detektionsstrahlung auf mehrere Detektoren oder Detektionsbereiche der mindestens einen Detektorvorrichtung lässt sich insbesondere dadurch realisieren, dass zwischen der Strahlteilervorrichtung und der Detektorvorrichtung eine weitere Strahlteilervorrichtung angeordnet ist, die auf die Detektorvorrichtung auftreffende elektromagnetische Strahlung zu  
20   unterschiedlichen Detektionsbereichen der Detektorvorrichtung weiterleitet.

Anstelle einer Strahlungserzeugungsvorrichtung können zweckmäßigerweise auch mehrere Strahlungserzeugungsvorrichtungen vorgesehen werden, deren elektromagnetische Strahlung in einzelne oder in mehrere unterschiedliche  
25   erste optische Fasern einkoppelbar ist.

Die mindestens eine Strahlteilervorrichtung weist vorzugsweise mehrere Strahlteilereinheiten auf, die einzelnen oder mehreren unterschiedlichen ersten optischen Fasern zugeordnet sind.

30

Um die Probenmessvolumina "scannen" zu können, d.h. um die Foki (Messvolumina) innerhalb einer Probe "verfahren" zu können, ist es zweckmäßig, eine Bewegungsvorrichtung vorzusehen, mittels derer die der Fokus-

sieroptik zugewandten Enden der zweiten Fasern in einer quer zu den Längsachsen der Fasern verlaufenden Ebene und/oder in Längsrichtung der Fasern einzeln und/oder gemeinsam bewegbar sind und/oder mittels derer die der Fokussieroptik zugewandten Enden der zweiten Fasern kippbar sind oder drehbar sind, und zwar vorzugsweise um eine zu deren Längsachsen parallele Achse.

Die Probenmessvolumina, die mit Hilfe der Erfindung gleichzeitig untersucht werden können, sind entweder innerhalb einer Probe voneinander separiert oder aber als einzelne Volumenbereiche einer gemeinsamen Probe definiert. So ist es beispielsweise möglich, mit Hilfe der Erfindung in Mikro- oder Nanotiterplatten untergebrachte oder auf einem chipförmigen Array, auf einer Membran oder sonstigen flächigen Unterlage oder in einem Durchflusssystem angeordnete Einzelproben einer Gesamtprobe zu untersuchen. Andererseits ist es aber auch möglich, innerhalb einer gemeinsamen Probe einzelne Bereiche dieser Probe zu untersuchen. Das zuvor angesprochene "Scannen" durch "Bewegen" der Foki infolge der Bewegung der der Fokussieroptik zugewandten Enden der Fasern des zweiten Faserbündels ist bei beiden Anwendungen einsetzbar.

Zweckmäßigerweise werden die Proben hinsichtlich mindestens einer der folgenden Eigenschaften der in ihnen vorhandenen Moleküle/Molekülkomplexe untersucht: Fluoreszenzlebensdauer, Schwingungszustand, Translations- oder Rotationsgeschwindigkeit, oder molekulare Helligkeit. Vorteilhafterweise wird die von den Proben emittierte zweite elektromagnetische Strahlung hinsichtlich mindestens einer der folgenden Eigenschaften untersucht: Polarisierung, spektrale Zusammensetzung, Intensität, oder Ausbreitungsrichtung. Zweckmäßigerweise umfasst die Verarbeitung der Messdaten die Erstellung von Histogrammen der pro Zeiteinheit von den Detektorbereichen der mindestens einen Detektorvorrichtung erfassten Photonen und/oder die Erstellung von Histogrammen der zwischen einzelnen Photonen liegenden Zeiteinheiten und/oder die Erstellung von Histogrammen der Zeitpunkt der Erfassung eines Photonen

relativ zu einem Referenzsignal und/oder die Erstellung von Korrelationsfunktionen.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung eignet sich insbesondere für die Spektroskopie, insbesondere Lumineszenzspektroskopie wie Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, molmassenunabhängige Fluoreszenztechniken, Ramanspektroskopie, Lichtstreuung, Absorptionsspektroskopie, insbesondere mit Ein- oder Mehrphotonenanregung. Vorzugsweise wird die erfindungsgemäße Vorrichtung in der Medizintechnik, in der Diagnostik oder in Screeningverfahren zum Auf-  
finden pharmakologischer Wirkstoffe Verwendung finden.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Zeichnung näher erläutert. Im einzelnen zeigen:

15 Fign. 1 und 2

konfokale Aufbauten ohne optische Fasern nach dem Stand der Technik und

Fign. 3 bis 5

20 schematisch den Aufbau eines erfindungsgemäßen konfokalen Mikroskops zur zeitlich hochaufgelösten Detektion von Einzelphotonen.

Fig. 3 zeigt ein erstes Ausführungsbeispiel einer Vorrichtung 30 zur Detektion von Einzelphotonen in einer Vielzahl von Probenmessvolumina. Bei dieser Vorrichtung 30 wird in einer als Laser ausgebildeten Strahlungserzeugungsvorrichtung 31 eine erste elektromagnetische Strahlung (nachfolgend Anregungsstrahlung) erzeugt und in eine Vielzahl von optischen Fasern 32 eines ersten Faserbündels 34 eingespeist. Aus diesen Fasern 32 ausgesendete Anregungsstrahlung trifft auf eine Strahlteilverrichtung 36, deren eigentlicher Strahlteiler 38 in diesem Fall als dichroitischer Spiegel ausgebildet ist. Bevor die Anregungsstrahlung auf den Strahlteiler auftrifft, passiert sie eine Kollimatorlinse 40, die die Bündel von Anregungsstrahlung, die aus den der Strahlteilver-

richtung 36 zugewandten Enden 42 der Fasern 32 des ersten Faserbündels 34 austreten, parallelisiert.

5 Diese parallelisierten Strahlenbündel gelangen hinter dem Strahlteiler 38 zu einer weiteren Kollimatorlinse 44, die die einzelnen Strahlenbündel auf die der Strahlteilervorrichtung 36 zugewandten Enden 46 von optischen Fasern 48 eines zweiten Faserbündels 50 fokussiert. Damit sind also die von den Enden 42 der Fasern 32 des ersten Faserbündels 34 gebildeten Punktlichtquellen auf die Enden 46 der Fasern 48 des zweiten Faserbündels 50 optisch abgebildet.

10

Die auf diese Weise gleichzeitig in das zweite Faserbündel 50 eingespeisten einzelnen Strahlenbündel treten an den anderen Enden 52 der Fasern 48 des zweiten Faserbündels 50 aus, um über eine Kollimatorlinse 54 und eine Fokussieroptik 56 in eine Vielzahl von in einem Fokussierbereich 58 angeordneten Foki 60 fokussiert zu werden. Es entstehen also mehrere Foki 60, deren Anzahl

15

Die Foki 60 definieren die zu untersuchenden Messvolumina einer (hier nicht dargestellten) Probe. In diesen Probenmessvolumina auf Grund der Anregungsstrahlung erzeugte Emissionsstrahlung wird auf die den einzelnen Probenmessvolumina zugeordneten Faserenden 52 des zweiten Faserbündels 50 abgebildet und auf diese Weise in das zweite Faserbündel 50 eingespeist. Nach Parallelisierung der einzelnen Emissionsstrahlungsbündel durch die Kollimatorlinse 44 der Strahlteilervorrichtung 36 wird die Emissionsstrahlung in dieser Strahlteilervorrichtung 36 separiert und verlässt die Strahlteilervorrichtung 36 auf einem von der Anregungsstrahlung verschiedenen optischen Pfad. Durch eine Kollimatorlinse 62 der Strahlteilervorrichtung 36 werden die einzelnen Emissionsstrahlungsbündel wieder fokussiert, und zwar auf die Enden 64 von optischen Fasern 66 eines dritten Faserbündels 68, das die Strahlung bis zu den verschiedenen Detektorbereichen 70 einer Detektorvorrichtung 72 leitet, die als Photomultiplier ausgebildet ist.

20

25

30



In Fig. 4 ist der in Fig. 3 mit IV gekennzeichnete Bereich nochmals vergrößert dargestellt.

Anstelle des zuvor beschriebenen dritten Faserbündels 68 könnten die die Strahlteilervorrichtung 36 verlassenden Emissionsstrahlungsbündel auch direkt auf die Detektorvorrichtung 72 auftreffen.

In Fig. 3 ist mit 74 eine Bewegungsvorrichtung gekennzeichnet, die auf die der Kollimatorlinse 54 und der Fokussieroptik 56 zugewandten Enden 52 der Fasern 48 des zweiten Faserbündels 50 einwirkt, um diese zu bewegen. Diese Bewegung kann in Form einer seitlichen Verschiebung oder Verschiebung in Längsrichtung oder Verdrehung um die Längsachse der Fasern 48 oder durch Kippen erfolgen. Die jeweils möglichen sich eventuell überlagernden Bewegungen sind in Fig. 3 durch Pfeile gekennzeichnet. Hierdurch lässt sich die Lage der Foki 60 innerhalb der Probe verschieben, wodurch diese abgetastet werden kann. Dies ist je nach den durchzuführenden Untersuchungen der Probe von Vorteil.

Fig. 5 zeigt eine alternative Ausgestaltung einer konfokalen Vorrichtung 80. Bei dieser Vorrichtung 80 sind mehrere Aufbauten gemäß Fig. 3 bzw. Fig. 4 kombiniert. Bei Verwendung einer gemeinsamen Fokussieroptik 56 und einer gemeinsamen Kollimatorlinse 54 kommen zwei oder mehrere zweite Faserbündel 50, zwei oder mehrere Strahlteilervorrichtungen 36, zwei oder mehrere Strahlungserzeugungsvorrichtungen 31, zwei oder mehrere Detektorvorrichtungen 70 und zwei oder mehrere erste und dritte Faserbündel 34 bzw. 68 zum Einsatz. Die Enden 52 der Fasern 48 der mehreren zweiten Faserbündel 50 lassen sich nunmehr gemeinsam über die Bewegungsvorrichtung 74 verschieben. Die aus diesen Enden austretende Anregungsstrahlung wird zur Bildung der Foki 60 in Richtung auf die Kollimatorlinse 54 und die Fokussieroptik 56 ausgesendet. Die Foki 60 lassen sich somit in mehrere Gruppen unterteilen, wobei diese Fokigruppen den Fasern 48 unterschiedlicher zweiter Faserbündel 50 zugeordnet sind. Auf diese Weise ist es möglich, unterschiedliche Anregungsstrahlung, die durch die unterschiedlichen Strahlungserzeugungsvor-

richtungen 31 erzeugt werden, in die Probe einzubringen. Diese unterschiedliche Anregungsstrahlung führt je nach Beschaffenheit der Probe zu unterschiedlicher Emissionsstrahlung, die auf die unterschiedlichen zweiten Faserbündel 50 aufgeteilt wird. Die Auskopplung der Emissionsstrahlung aus den  
5 und die Einkopplung der Anregungsstrahlung in die Fasern 48 der zweiten Faserbündel 50 erfolgt auf die gleiche Weise, wie es weiter oben anhand der Fign. 3 und 4 beschrieben ist.

Eine Variante der Ausführungsbeispiele gemäß den Fign. 3 und 5 ist darin zu  
10 sehen, dass die eine Strahlteilervorrichtung 36 verlassende Emissionsstrahlung durch Vorsehen einer oder mehrerer weiterer Strahlteilervorrichtungen auf mehrere Detektorvorrichtungen 70 aufgeteilt wird. Die Weiterleitung der Emissionsstrahlung von diesen weiteren Strahlteilervorrichtungen zu den einzelnen Detektorvorrichtungen kann ohne oder mit optischen Fasern erfolgen.

15 In den beiden erfindungsgemäßen Ausführungsbeispielen wird die Funktion der nach dem Stand der Technik für Anregungs- und Detektionslicht gemeinsamen Gesichtsfeldblende von den Enden von (Monomode-) Glasfasern als Fasern des ersten Faserbündels übernommen. Von hier ausgehendes divergentes Anregungslicht wird von der Kollimatorlinse 54 so weit kollimiert, dass die Anforderungen der eingesetzten Fokussieroptik 56 (Mikroskopobjektiv) an die  
20 Tubuslänge hinreichend genau erfüllt werden. Mit dieser Kollimatorlinse 54 können auch restliche Farbfehler der Fokussieroptik 56 ausgeglichen werden. Entsprechend den Anforderungen an die spektrale Empfindlichkeit können im  
25 Detektionsstrahlengang hinter der Kollimatorlinse 62 noch farb- oder polarisationsselektive Elemente, etwa Bandpass-Filter, hinzugefügt werden. Das Bild der Faserenden 52 definiert die Brennpunkte 60 in der Probe. Da die Abbildung in beide Richtungen (Faser/Probe und Probe/Faser) umkehrbar ist, liegt das Bild der Foki automatisch auf den Enden 52 der Fasern 48. Eine Justage ist  
30 nicht erforderlich.

Durch Verschieben der Faserenden 52 ("Scannen") ändern sich die Positionen der Messvolumina in der Probe. Sind die Relativpositionen der Messvolumina

zueinander bekannt, kann dies z.B. zur beschleunigten Aufnahme von Bildern der Probe oder zum gezielten, sequentiellen Abscannen identischer Probenbereich mit unterschiedlichen experimentellen Parametern (Laserintensitäten, -polarisationen, -wellenlängen, Detektionsfilter, etc.) eingesetzt werden.

5

Werden für die Fasern 48 Monomode-Fasern gewählt und ist die Abbildung nur durch Beugung begrenzt, können die Foki kleinstmögliche Größe annehmen. Der Fokusbereich ist dann umgekehrt proportional zur Wellenlänge und proportional zur numerischen Apertur ( $N_a$ ) des fokussierten Strahles (die vom Strahldurchmesser und der Brennweite der Fokussieroptik bestimmt wird).

10

Ein Vorteil für polychromatische Anwendungen ist in diesem Aufbau die (Näherungsweise) Unabhängigkeit der Fokusgröße von der Wellenlänge. In guter Näherung ist der Divergenzwinkel des aus der Faser austretenden Lichtes proportional zur Wellenlänge. Die  $N_a$  (auf der Brennpunktseite) steigt daher mit der Wellenlänge an, so dass der Fokusbereich fast wellenlängenunabhängig ist.

15

Der Fall eines minimalen Messvolumens ist besonders für FCS-Messungen von Vorteil. Das Signal zum Rausch-Verhältnis steigt mit den Kehrwerten von Besetzungszahl wie auch der zum Passieren des Messvolumens benötigten "Diffusionszeit" eines Moleküls durch den Fokus.

20

Für Anwendungen, die größere Messvolumina erfordern, kann die Fokussierstärke der Optik reduziert werden. Dann wird jedoch auch die Lichtsammelleffizienz verringert, so dass von einzelnen Molekülen eine geringere Anzahl von emittierten Photonen detektiert werden kann.

25

Alternativ dazu kann Anstelle der Monomode-Glasfaser ein Wellenleiter mit größerem Kerndurchmesser eingesetzt werden. Dieser ist dann im Allgemeinen nicht mehr monomodal, so dass die Abbildung nicht beugungsbegrenzt ist, dafür kann er die hohe Lichtsammelleffizienz der Fokussieroptik hoher  $N_a$  besser ausnutzen.

30

**ANSPRÜCHE**

1. Hochdurchsatzscreening-Verfahren zur optischen Erfassung von Proben mit den Schritten:
  - Erzeugen einer ersten elektromagnetischen Strahlung mit mindestens einer Strahlungserzeugungsvorrichtung (31),
  - Leiten der ersten elektromagnetischen Strahlung simultan in einer Vielzahl von ersten optischen Fasern (34) zu mindestens einer Strahlteilervorrichtung (36), von der ausgehend die erste elektromagnetische Strahlung simultan in einer Vielzahl von zweiten optischen Fasern (48) zu einer Fokussieroptik (56) geleitet wird,
  - Fokussieren der ersten elektromagnetischen Strahlung mittels der Fokussieroptik (56) simultan in eine Vielzahl von Foki (60), die innerhalb zu erfassender Probenmessvolumina liegen,
  - Leiten einer von den Probenmessvolumina emittierten zweiten elektromagnetischen Strahlung mittels der Vielzahl von zweiten optischen Fasern (48) von der Fokussieroptik (56) zu der mindestens einen Strahlteilervorrichtung (36), von der ausgehend die zweite elektromagnetische Strahlung zu getrennten Detektorbereichen (70) mindestens einer Detektorvorrichtung (72) weitergeleitet wird, die außerhalb des sich von der mindestens einen Strahlungserzeugungsvorrichtung (31) über die mindestens eine Strahlteilervorrichtung (36) bis zur Fokussieroptik (56) erstreckenden Strahlenganges angeordnet sind und die die zweite elektromagnetische Strahlung erfassen, und

- Verarbeiten von Messdaten, die auf der Grundlage der erfassten zweiten elektromagnetischen Strahlung generierten werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Erfassung der zweiten elektromagnetischen Strahlung zeitaufgelöst erfolgt, insbesondere mit einer zeitlichen Auflösung von kleiner als 1 ms, besonders bevorzugt kleiner als 1  $\mu$ s, insbesondere besonders bevorzugt mit einer zeitlichen Auflösung, die die Detektion einzelner Photonen erlaubt.
  3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Probenmessvolumina arrayförmig angeordnet sind und dass für jedes Probenmessvolumina ein Fokus (60) erzeugt wird.
  4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Probenmessvolumina in einer Mikro- oder Nanotiterplatte, einem chipförmigen Array, auf einer Membran oder sonstigen flächigen Unterlage, oder in einem Durchflusssystem angeordnet sind.
  5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Probenmessvolumina hinsichtlich mindestens einer der folgenden Eigenschaften der in ihnen vorhandenen Moleküle/Molekülkomplexe untersucht werden: Fluoreszenzlebensdauer, Schwingungszustand, Translations- oder Rotationsgeschwindigkeit, Helligkeit einzelner Moleküle/Molekülkomplexe, oder Gesamthelligkeit der Probe.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die von den Probenmessvolumina emittierte zweite elektromagnetische Strahlung hinsichtlich mindestens einer der folgenden Eigenschaften untersucht wird: Polarisierung, spektrale Zusammensetzung, Intensität, Ausbreitungsrichtung oder zeitliche Abfolge der auf die Detektorbereiche (70) der Detektorvorrichtung (72) auftreffenden Photonen.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Verarbeitung der Messdaten die Erstellung von Histogrammen der pro Zeiteinheit von den Detektorbereichen (70) der mindestens einen Detektorvorrichtung (72) erfassten Photonen, und/oder die Erstellung von Histogrammen der zwischen einzelnen Photonen liegenden Zeiteinheiten, und/oder die Erstellung von Histogrammen der Zeitpunkte der Erfassung einzelner Photonen relativ zu einem Referenzsignal, und/oder die Erstellung von Korrelationsfunktionen umfasst.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Probenmessvolumina mit bildgebenden oder spektroskopischen Analysetechniken, insbesondere Lumineszenzspektroskopie wie FCS, molmassenunabhängigen Fluoreszenztechniken, Ramanspektroskopie, Lichtstreuung, oder Absorptionsspektroskopie, untersucht wird.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Fokussieroptik (56) farblängskorrigiert ist und/oder die Fokussieroptik (56) eine numerische Apertur von größer als oder gleich 0,6 vorzugsweise 0,9 und insbesondere 1,2 aufweist.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die zweite elektromagnetische Strahlung mittels einer Vielzahl von dritten optischen Fasern (66) von der mindestens einen Strahlteilervorrichtung (36) zu den Detektorbereichen (70) der mindestens einen Detektorvorrichtung (72) geleitet wird.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Vielzahl von ersten, zweiten und/oder dritten Fasern (32,48,66) jeweils bündelförmig angeordnet sind.
12. Hochdurchsatzscreening-Vorrichtung zur optischen Erfassung von Probenvolumina mit
  - mindestens einer Strahlungserzeugungsvorrichtung (31) für eine erste elektromagnetische Strahlung,
  - einer Fokussieroptik (56) zur Fokussierung der ersten elektromagnetischen Strahlung simultan in eine Vielzahl von innerhalb der zu erfassenden Probenmessvolumina liegenden Foki (60),
  - mindestens einer Strahlteilervorrichtung (36), die zwischen der mindestens einen Strahlungserzeugungsvorrichtung (31) und der Fokus-

- sieroptik (56) angeordnet ist und die die erste elektromagnetische Strahlung zur Fokussieroptik (56) weiterleitet,
- mindestens einer Detektorvorrichtung (72), die außerhalb des sich von der mindestens einen Strahlungserzeugungsvorrichtung (31) über die mindestens eine Strahlteilervorrichtung (36) bis zur Fokussieroptik (56) erstreckenden Strahlenganges angeordnet ist und die durch die mindestens eine Strahlteilervorrichtung (31) separierte von der Vielzahl der Foki (60) ausgehende zweite elektromagnetische Strahlung empfängt, wobei
  - zwischen der mindestens einen Strahlungserzeugungsvorrichtung (31) und der mindestens einen Strahlteilervorrichtung (36) eine Vielzahl von ersten optischen Fasern (32) angeordnet ist, aus deren der mindestens einen Strahlteilervorrichtung (36) zugewandten Enden (42) von der mindestens einen Strahlungserzeugungsvorrichtung (31) in die dieser zugewandte Enden der ersten optischen Fasern (32) eingespeiste erste elektromagnetische Strahlung austritt,
  - zwischen der mindestens einen Strahlteilervorrichtung (36) und der Fokussieroptik (56) eine Vielzahl von zweiten optischen Fasern (48) angeordnet ist,
  - die der mindestens einen Strahlteilervorrichtung (36) zugewandten Enden (42) der ersten optischen Fasern (32) auf die der mindestens einen Strahlteilervorrichtung (36) zugewandten Enden (46) der zweiten optischen Fasern (48) optisch abgebildet sind,
  - aus den der Fokussieroptik (56) zugewandten Enden (52) der zweiten optischen Fasern (48) austretende erste elektromagnetische Strah-



lung durch die Fokussieroptik (56) in eine Vielzahl von Foki (60) innerhalb der zu erfassenden Probenmessvolumina fokussiert ist und

- die der mindestens einen Strahlteilervorrichtung (36) zugewandten Enden (46) der zweiten optischen Fasern (48) zur Detektion der zweiten elektromagnetischen Strahlung mindestens einer Detektorvorrichtung (70) optisch zugeordnet sind.

13. Vorrichtung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektorvorrichtung (70) die zweite elektromagnetische Strahlung zeitaufgelöst erfasst, insbesondere mit einer zeitlichen Auflösung von kleiner als 1 ms, besonders bevorzugt kleiner als 1  $\mu$ s, insbesondere besonders bevorzugt mit einer zeitlichen Auflösung, die die Detektion einzelner Photonen erlaubt.
14. Vorrichtung nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Fokussieroptik (56) farblängskorrigiert ist und /oder eine numerische Apertur von größer als oder gleich 0,6, vorzugsweise 0,9 und insbesondere 1,2 aufweist.
15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Fokussieroptik (56) optische Elemente aufweist, die im wesentlichen refraktiv arbeiten.
16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen der mindestens einen Strahlteilervorrichtung (36) und

der mindestens einen Detektorvorrichtung (70) eine Vielzahl von dritten Fasern (66) angeordnet ist, wobei die der mindestens einen Strahlteiler-  
vorrichtung (36) zugewandten Enden (46) der zweiten Fasern (48) auf  
die der mindestens einen Strahlteiler-  
vorrichtung (36) zugewandten Enden  
(64) der dritten Fasern (66) optisch abgebildet sind und die der min-  
destens einen Strahlteiler-  
vorrichtung (36) abgewandten Enden der dritten  
Fasern (66) auf die mindestens eine Detektorvorrichtung (70) abgebildet  
sind.

17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 16, dadurch gekennzeich-  
net, dass die Enden (42,46,52,64) der Fasern (32,48,66) zur Erzeugung  
eines hohen Grades an optischer Aus- und Einkopplung der ersten und  
zweiten elektromagnetischen Strahlung entspiegelte Stirnflächen aufwei-  
sen.
18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 17, dadurch gekennzeich-  
net, dass die mindestens eine Strahlteiler-  
vorrichtung (36) die erste und  
zweite elektromagnetische Strahlung in Abhängigkeit von ihrer Polaris-  
ation, ihrer Ausbreitungsrichtung, ihrer Wellenlänge und/oder ihrer Inten-  
sität separiert.
19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 18, dadurch gekennzeich-  
net, dass zwischen der mindestens einen Detektorvorrichtung (70) und  
der mindestens einen Strahlteiler-  
vorrichtung (36) eine weitere Strahltei-  
lervorrichtung angeordnet ist, die von der Strahlteiler-  
vorrichtung (36)

kommende zweite elektromagnetische Strahlung zu unterschiedlichen Bereichen der Detektorvorrichtung (70) weiterleitet.

20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass mehrere Strahlerzeugungsvorrichtungen (31) vorgesehen sind, deren elektromagnetische Strahlung in einzelne oder in mehrere unterschiedliche erste optische Fasern (32) einkoppelbar sind.
21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Strahlteilervorrichtung (36) mehrere Strahlteilereinheiten aufweist, die einzelnen oder mehreren der ersten und/oder zweiten und/oder dritten optischen Fasern (32,48,66) zugeordnet sind.
22. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass eine Bewegungsvorrichtung (74) vorgesehen ist, mittels derer die der Fokussieroptik (56) zugewandten Enden (52) der zweiten Fasern (48) in einer quer zu den Längsachsen der Fasern (48) verlaufenden Ebene und/oder in Längsrichtung der Fasern (48) einzeln und/oder gemeinsam bewegbar sind und/oder mittels derer die der Fokussieroptik (56) zugewandten Enden (52) der zweiten Fasern (48) kippbar oder drehbar sind, und zwar vorzugsweise um eine zu deren Längsachsen parallele Achse.

23. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Vielzahl von ersten, zweiten und/oder dritten Fasern (32,48,66) jeweils bündelförmig angeordnet sind.
24. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 23 für die Spektroskopie, insbesondere Lumineszenzspektroskopie wie Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS), molmassenunabhängige Fluoreszenztechniken, Ramanspektroskopie, Lichtstreuung, Absorptionsspektroskopie, oder für die Mikroskopie, jeweils insbesondere mit Ein- oder Mehrphotonenanregung.
25. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 23 in Screeningverfahren zum Auffinden biologisch-chemischer, insbesondere pharmakologischer, Wirkstoffe oder der Hochdurchsatz-Diagnostik

- 1/3 -

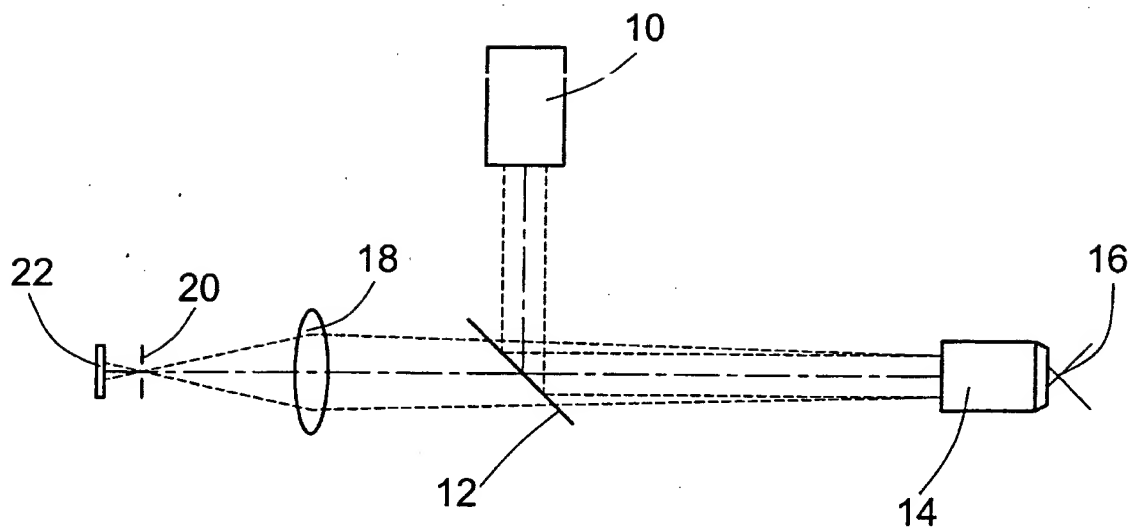


FIG.1  
Stand der Technik

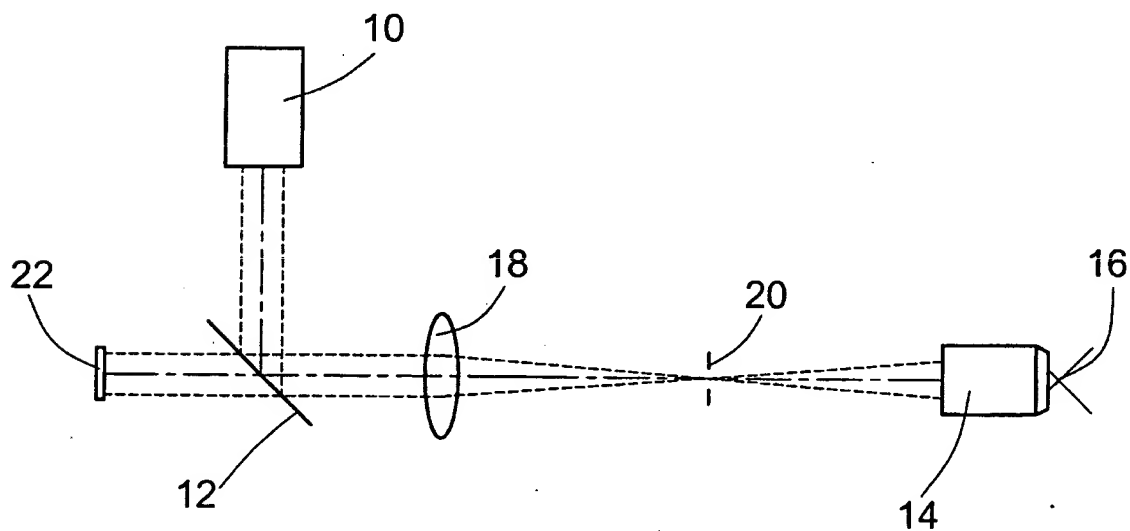
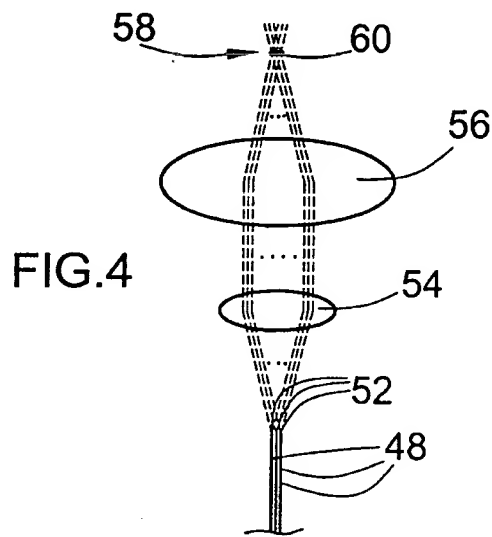
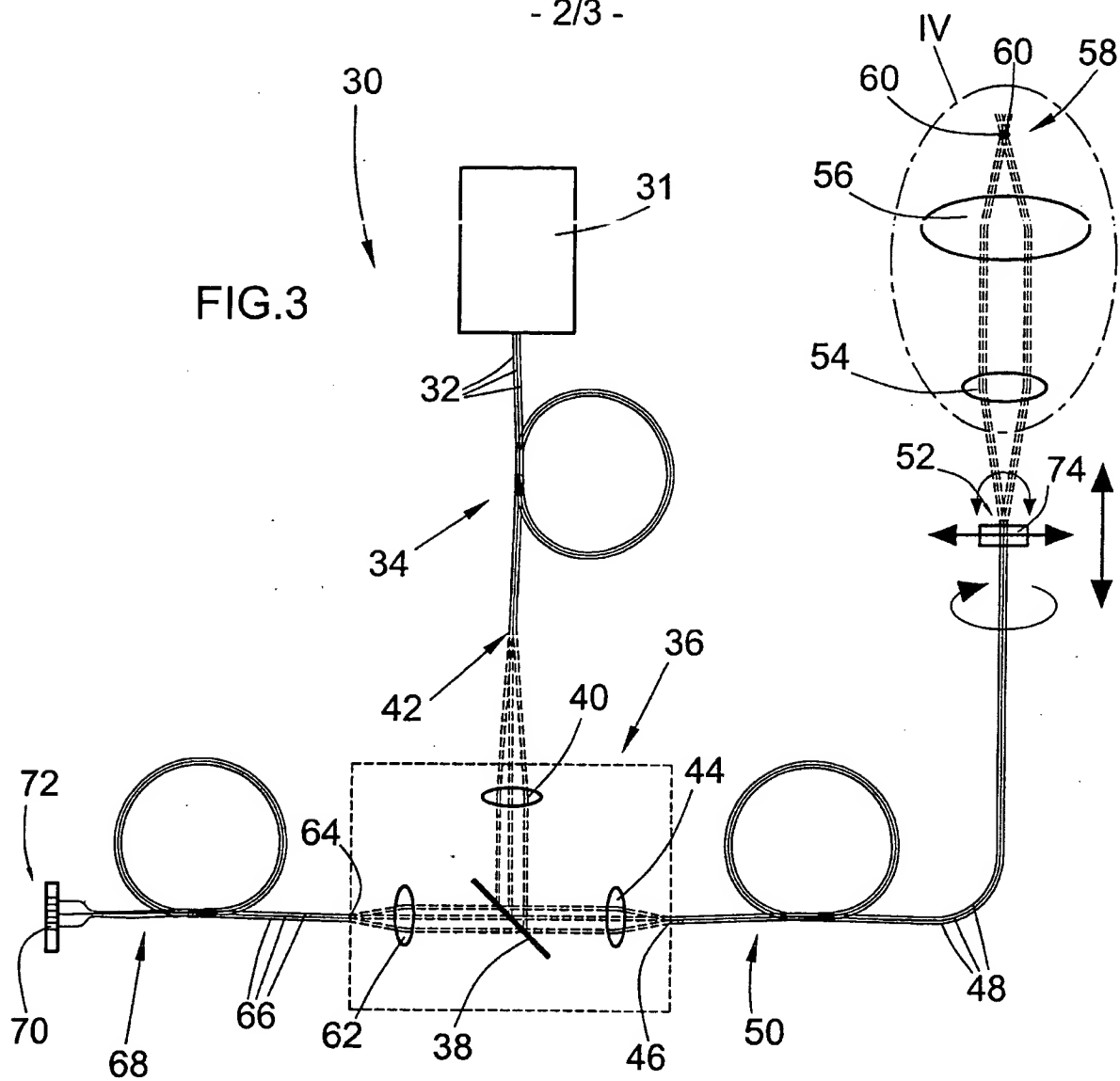
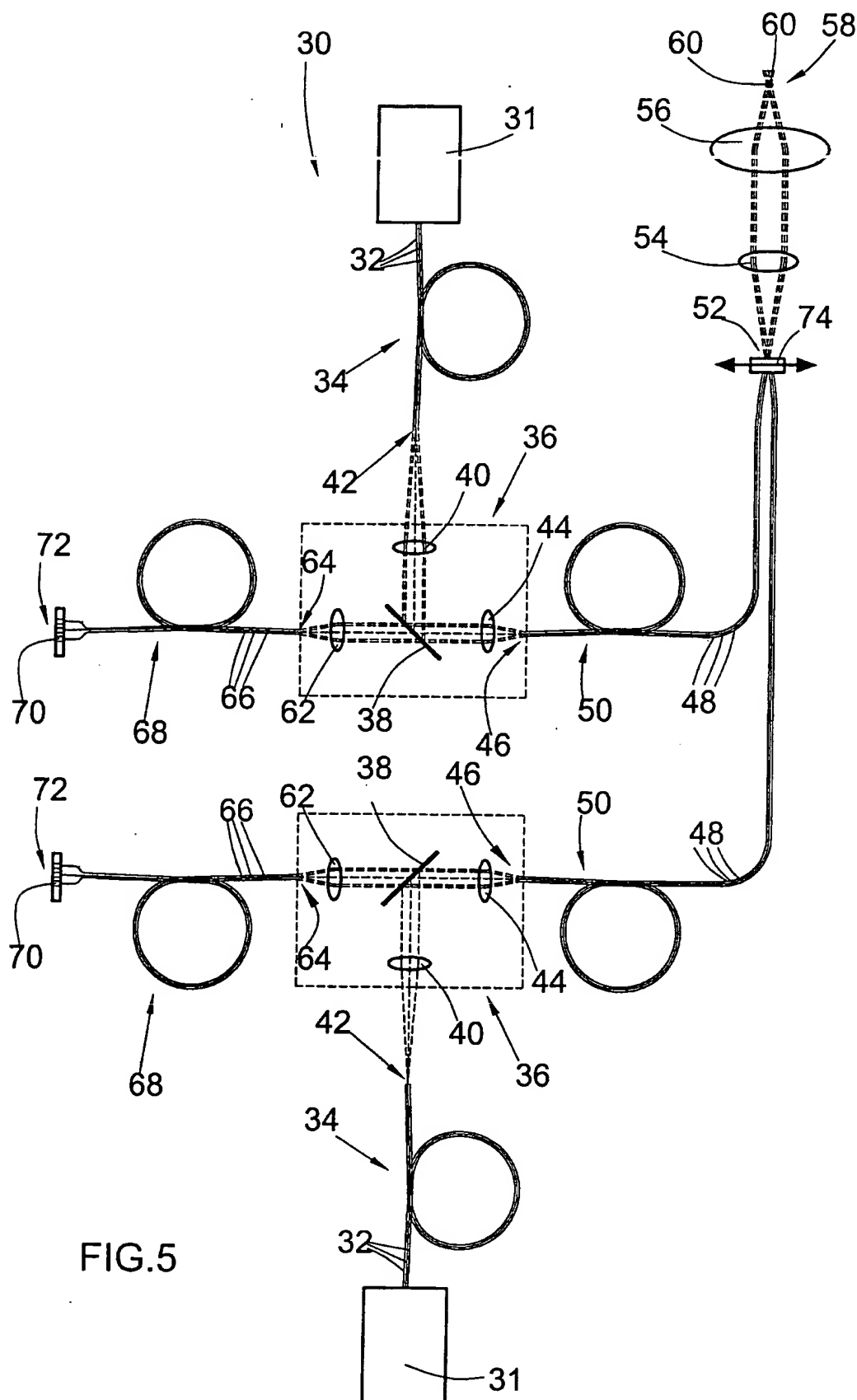


FIG.2  
Stand der Technik

- 2/3 -



- 3/3 -



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
7. Juni 2001 (07.06.2001)

PCT

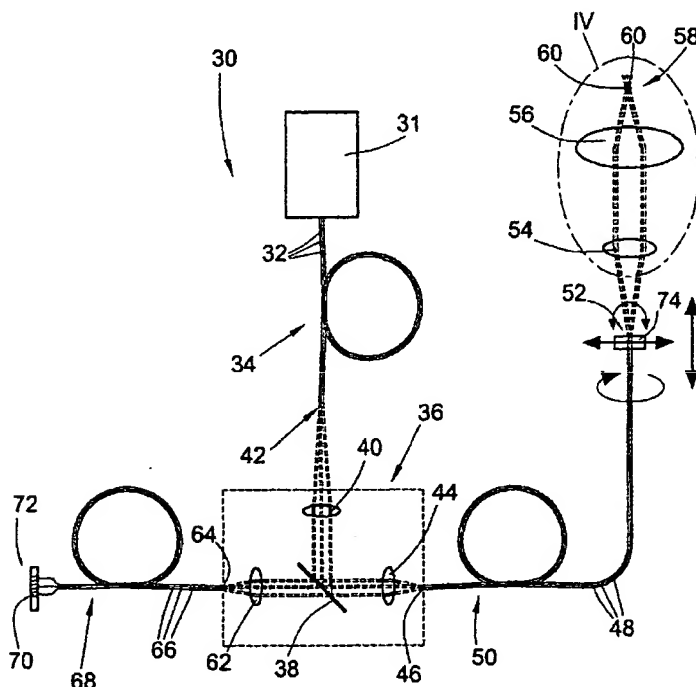
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/40769 A3**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: G01N 21/64 (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): EVOTEC BIOSYSTEMS AG [DE/DE]; Schnackenburgallee 114, 22525 Hamburg (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/12126 (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GARBOW, Norbert [DE/DE]; Kamerstuecken 28, 22589 Hamburg (DE).
- (22) Internationales Anmeldedatum: 2. Dezember 2000 (02.12.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (74) Anwälte: HILLERINGMANN, Jochen usw.; Postfach 10 22 41, 50462 Köln (DE).
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (81) Bestimmungsstaaten (national): AU, JP, US.
- (30) Angaben zur Priorität: 199 57 974.1 2. Dezember 1999 (02.12.1999) DE (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: HIGH RATE SCREENING METHOD AND DEVICE FOR OPTICALLY DETECTING SAMPLES

(54) Bezeichnung: HOCHDURCHSATZSCREENING-VERFAHREN UND -VORRICHTUNG ZUR OPTISCHEN ERFASSUNG VON PROBEN



(57) Abstract: The invention relates to a high rate screening method according to which a first electromagnetic radiation is generated by at least one radiation generating device (31) and this radiation is simultaneously guided in a multitude of first optical fibers (34) to at least one beam splitting device (36) from which the first electromagnetic radiation is simultaneously guided in a multitude of second optical fibers (48) to focussing optics (56). Said focussing optics (56) are used to simultaneously focus the first electromagnetic radiation into a multitude of foci (60), which are located inside the measurement volumes of the sample that are to be detected. The second electromagnetic radiation emitted by the measurement volumes of the sample is guided by means of the multitude of second optical fibers (48) from the focussing optics (56) to the at least one beam splitting device (36) from which the second electromagnetic radiation is routed to separate detector regions (70) of at least one detector device (72). Said detector regions are arranged outside of the beam path, which extends from the at least one

radiation generating device (31) via the at least one beam splitting device (36) and up to the focussing optics (56), and they detect the second electromagnetic radiation. The measured data which is generated on the basis of the detected second electromagnetic radiation is processed.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 01/40769 A3



**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

**(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen****Recherchenberichts:**

13. Dezember 2001

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

**(57) Zusammenfassung:** Für das Hochdurchsatzscreening wird eine erste elektromagnetische Strahlung mit mindestens einer Strahlungserzeugungsvorrichtung (31) erzeugt und diese simultan in einer Vielzahl von ersten optischen Fasern (34) zu mindestens einer Strahlteilvervorrichtung (36) geleitet, von der ausgehend die erste elektromagnetische Strahlung simultan in einer Vielzahl von zweiten optischen Fasern (48) zu einer Fokussieroptik (56) geleitet wird. Die erste elektromagnetische Strahlung wird mittels der Fokussieroptik (56) simultan in eine Vielzahl von Foki (60) fokussiert, die innerhalb zu erfassender Probenmessvolumina liegen. Von den Probenmessvolumina emittierte zweite elektromagnetische Strahlung wird mittels der Vielzahl von zweiten optischen Fasern (48) von der Fokussieroptik (56) zu der mindestens einen Strahlteilvervorrichtung (36) geleitet, von der ausgehend die zweite elektromagnetische Strahlung zu getrennten Detektorbereichen (70) mindestens einer Detektorvorrichtung (72) weitergeleitet wird, die außerhalb des sich von der mindestens einen Strahlungserzeugungsvorrichtung (31) über die mindestens eine Strahlteilvervorrichtung (36) bis zur Fokussieroptik (56) erstreckenden Strahlenganges angeordnet sind und die die zweite elektromagnetische Strahlung erfassen. Die Messdaten, die auf der Grundlage der erfassten zweiten elektromagnetischen Strahlung generiert werden, werden verarbeitet.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/12126

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N21/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 780 857 A (HARJU RAIMO ET AL) 14 July 1998 (1998-07-14) column 1, line 7 - line 11 column 3, line 51 - column 4, line 29 column 6, line 10 - line 54 figure 1 ---	1,3-5,8, 12
A	US 5 589 351 A (HAROOTUNIAN ALEC T) 31 December 1996 (1996-12-31)  column 1, line 5 - line 13 column 7, line 15 - column 8, line 31 figures 1,5 ---	1-5,8, 11-13, 23-25
A	US 5 161 053 A (DABBS TIMOTHY P) 3 November 1992 (1992-11-03) column 8, line 15 - column 9, line 40 figure 3 ---	1,12
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \* & \* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 May 2001

Date of mailing of the international search report

25/05/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Krametz, E

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No

PCT/EP 00/12126

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 430 816 A (ODA GEN ET AL) 4 July 1995 (1995-07-04) claim 1; figure 8 ---	1, 12
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 2000, no. 01, 31 January 2000 (2000-01-31) & JP 11 271227 A (HAMAMATSU PHOTONICS KK), 5 October 1999 (1999-10-05) abstract -----	1, 12

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/12126

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5780857 A	14-07-1998	NONE	
US 5589351 A	31-12-1996	CA 2207058 A EP 0804746 A JP 10510049 T WO 9618115 A	13-06-1996 05-11-1997 29-09-1998 13-06-1996
US 5161053 A	03-11-1992	AU 652713 B AU 610430 B AU 3985489 A AU 617289 A AU 8250391 A WO 9001716 A CA 1325537 A DE 68929262 D EP 0427755 A EP 0764866 A JP 4500129 T	08-09-1994 16-05-1991 05-03-1990 04-10-1991 21-11-1991 22-02-1990 28-12-1993 14-12-2000 22-05-1991 26-03-1997 09-01-1992
US 5430816 A	04-07-1995	JP 2604949 B JP 6134590 A JP 2507222 B JP 6055288 A JP 3006348 B JP 6328282 A JP 7056028 A	30-04-1997 17-05-1994 12-06-1996 01-03-1994 07-02-2000 29-11-1994 03-03-1995
JP 11271227 A	05-10-1999	NONE	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/12126

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N21/64

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 780 857 A (HARJU RAIMO ET AL) 14. Juli 1998 (1998-07-14) Spalte 1, Zeile 7 - Zeile 11 Spalte 3, Zeile 51 - Spalte 4, Zeile 29 Spalte 6, Zeile 10 - Zeile 54 Abbildung 1	1,3-5,8, 12
A	US 5 589 351 A (HAROOTUNIAN ALEC T) 31. Dezember 1996 (1996-12-31)  Spalte 1, Zeile 5 - Zeile 13 Spalte 7, Zeile 15 - Spalte 8, Zeile 31 Abbildungen 1,5	1-5,8, 11-13, 23-25
A	US 5 161 053 A (DABBS TIMOTHY P) 3. November 1992 (1992-11-03) Spalte 8, Zeile 15 - Spalte 9, Zeile 40 Abbildung 3	1,12
-/-		



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. Mai 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

25/05/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Krametz, E

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/12126

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 430 816 A (ODA GEN ET AL) 4. Juli 1995 (1995-07-04) Anspruch 1; Abbildung 8 ---	1,12
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 2000, no. 01, 31. Januar 2000 (2000-01-31) & JP 11 271227 A (HAMAMATSU PHOTONICS KK), 5. Oktober 1999 (1999-10-05) Zusammenfassung -----	1,12

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/12126

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5780857 A	14-07-1998	KEINE	
US 5589351 A	31-12-1996	CA 2207058 A	13-06-1996
		EP 0804746 A	05-11-1997
		JP 10510049 T	29-09-1998
		WO 9618115 A	13-05-1996
US 5161053 A	03-11-1992	AU 652713 B	08-09-1994
		AU 610430 B	16-05-1991
		AU 3985489 A	05-03-1990
		AU 617289 A	04-10-1991
		AU 8250391 A	21-11-1991
		WO 9001716 A	22-02-1990
		CA 1325537 A	28-12-1993
		DE 68929262 D	14-12-2000
		EP 0427755 A	22-05-1991
		EP 0764866 A	26-03-1997
		JP 4500129 T	09-01-1992
US 5430816 A	04-07-1995	JP 2604949 B	30-04-1997
		JP 6134590 A	17-05-1994
		JP 2507222 B	12-06-1996
		JP 6055288 A	01-03-1994
		JP 3006348 B	07-02-2000
		JP 6328282 A	29-11-1994
		JP 7056028 A	03-03-1995
JP 11271227 A	05-10-1999	KEINE	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**